

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-044891

(43)Date of publication of application : 25.02.1988

(51)Int.Cl.

C12P 7/40
//C12P 7/40
C12R 1:645)

(21)Application number : 62-015920

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 28.01.1987

(72)Inventor : SHINMEN YOSHIJI
YAMADA HIDEAKI
SHIMIZU AKIRA

(30)Priority

Priority number : 61 71270 Priority date : 31.03.1986 Priority country : JP

(54) PRODUCTION OF ARACHIDONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce arachidonic acid or arachidonic acid-containing lipid in high yield and in a short time, by cultivating a microorganism belonging to the genus *Mortierella* in a medium having a hydrocarbon, fatty acid, fatty acid salt or fats and oils.

CONSTITUTION: A preculture solution of a microorganism such as *Mortierella elongate* SAM0219, *Mortierella exigua* IF08571, etc., belonging to the genus *Mortierella*, capable of producing arachidonic acid, is inoculated into a liquid or a solid medium and cultivated. Production of arachidonic acid can be increased by adding a hydrocarbon such as hexadecane, etc., a fatty acid such as oleic acid, etc., or fats and oils such as olive oil, coconut oil, etc. Arachidonic acid-containing lipid is obtained by solvent extraction from the mold.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑤ Int. Cl.⁴
C 12 P 7/40
// (C 12 P 7/40
C 12 R 1:645)

識別記号

庁内整理番号

7236-4B

④ 公開 昭和63年(1988)2月25日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑬ 発明の名称 アラキドン酸の製造方法

⑭ 特 願 昭62-15920

⑮ 出 願 昭62(1987)1月28日

優先権主張 ⑯ 昭61(1986)3月31日 ⑰ 日本(JP) ⑱ 特願 昭61-71270

⑲ 発 明 者	新 免 芳 史	京都府乙訓郡大山崎町円明寺鳥居前8の1 S-304
⑲ 発 明 者	山 田 秀 明	京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1
⑲ 発 明 者	清 水 昌	京都府京都市中京区西の京伯楽町14
⑲ 出 願 人	サントリー株式会社	大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
⑲ 代 理 人	弁理士 青 木 朗	外5名

明 細 書

1. 発明の名称

アラキドン酸の製造方法

2. 特許請求の範囲

1. モルティエラ(*Mortierella*) 属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸、又はアラキドン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてアラキドン酸を採取することを特徴とするアラキドン酸の製造方法。

2. 培養開始前の培地に炭化水素、脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 培養中の培養液に脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は醗酵法によるアラキドン酸の製造方法に関する。

〔従来の技術〕

従来から、微生物によるアラキドン酸の生産方法としては、炭素源として、炭水化物、又は炭化水素を用い、微生物として、ペニシリウム(*Penicillium*) 属、アズベルギルス(*Aspergillus*) 属、ロードトルラ(*Rhodotorula*) 属、又はフザリウム(*Fusarium*) 属に属する微生物を使用する方法が報告されている(特公昭56-19231、56-19232、56-19233を参照のこと)。

しかしながら、いずれの方法においても収量が低く、または培養時間が長く、あるいは、工程が複雑である。

また、モルティエラ(*Mortierella*) 属の微生物を用いるアラキドン酸の製造方法は知られていない。

〔発明が解決しようとする問題点〕

本発明は、従来アラキドン酸を生産する能力を有することが知られていなかったモルティエラ属微生物を使用して、安価な常用の培地を用いて、

3. 生理的性質

最適生育条件

pH: 6 - 9

温度: 20 - 30℃

生育の範囲

pH: 4 - 10

温度: 5 - 40℃

以上の菌学的諸性質に従い本発明の菌株 (S A M-0219) の分類学的位置の検索を、J. A. von Arx, "The Genera of Fungi sporulating in Pure Culture," 3rd ed., J. Cramer, 1981およびK. H. Domsch, W. Gams, & T.-H. Anderson, "Compendium of Soil Fungi," Academic Press, 1980に準拠して求めると、胞子のう柄の先端に球状の胞子のうを形成する、柱軸を持たない、胞子のう胞子に付属糸がない、培養菌糸がニンニクに類似した臭いを発する、ということから本菌株はMortierella 属に属する真菌であると考えられる。

そこで、W. Gams, "A key to the species of Mortierella," Persoonia 9, 381-391, 1977に準

拠して既知の Mortierella 属の種類と菌学的諸性質を比較すると、本菌株はコロニーがビロード状でない、培養菌糸がニンニクに類似した臭いを発する、胞子のう柄が長さ87.5-320 μmで分岐は下部でのみ生じ、葡萄の房状に分岐しない、胞子のうは内部に多数の胞子のう胞子を含む、ということから Mortierella 属 Mortierella 亜属 (Sugem. Mortierella) Hygrophila 節 (Sect. Hygrophila) に含まれると考えられる。Hygrophila 節には22種が含まれている。本菌株とこれら22種と菌学的諸性質を比較すると、本菌株は Mortierella zychae, M. elongatula, および M. elongata の3種に類似すると考えられる。そこで、K. H. Domsch, W. Gams, & T.-H. Anderson, "Compendium of Soil Fungi," Academic Press, 1980、およびW. Gams, "Some new or noteworthy species of Mortierella," Persoonia 9, 111-140, 1977、およびG. Linnemann, "Mortierella Coemans 1863." H. Zycha & R. Siepmann, "Mucorales Eine Beschreibung Aller Gattungen und Arten dieser

(7)

Pilzgruppe," pp. 155-140, J. Cramer, 1969を参考にして、本菌株とこれら3種と菌学的諸性質を比較した。本菌株は、M. zychaeとは胞子のう柄の長さ基部の幅、胞子のうの大きさで、明瞭に異なる。M. elongatulaとは胞子のう胞子の形態と大きさで、明瞭に異なる。M. elongataとは胞子のう柄がやや短い、厚膜胞子の形態が楕円形または垂球形でときに連鎖することがあり、さらに厚膜胞子がときに数本の菌糸を周囲に出す、という点で異なるが、本発明者らはこのような差異は本菌株を Mortierella elongata と別種であるとするには十分でない判断した。そこで、本発明者らは本菌株を Mortierella elongata SAM 0219 と同定した。SAM 0219株は昭和61年3月19日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所 (FRI) に受託番号 FERM BP-1239として寄託されている。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の胞子、菌糸又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコー

(9)

(8)

ス、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものがいずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステイプリカー等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。その他必要に応じてリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1~30重量%、好ましくは1~10重量%、窒素源は0.01~5重量%、好ましくは0.1~2重量%の濃度とするのが良い。又、培養温度は5~40℃、好ましくは20~30℃とし、培地のpHは4~10、好ましくは6~9として、通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行なう。培養は通常2

(10)

ないで採取するには、前記の抽出脂質をアルカリ分解（例えば5%水酸化ナトリウムにより室温にて2～3時間）した後、この分解液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1.

グルコース5%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%及び麦芽エキス0.3%を含む培地（pH6.0）50mlを500ml容坂口フラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・エロンガタ SAM 0219 (FERM BP-1239) 1白金耳を接種し、レシプロシェーカー（110rpm）により28℃で5日間振盪培養した。培養後、濾過にて菌体を回収し、十分水洗した後、凍結乾燥した。これにより、1.3gの乾燥菌体を得た。この菌体より、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いる Bligh & Dyer の抽出法によって総脂質を抽出したところ、320mgの脂質が得られた。この脂質を無

(15)

それぞれ32mg/g、19mg/gであった。

実施例 2

実施例1と同じ組成の培地5ℓを15ℓジャーファーマンターに仕込み、120℃で40分間殺菌後、モルティエラ・エロンガタ SAM 0219 (FERM BP-1239) の前培養液 200ml を接種した。30℃、通気量 0.5v.v.m. で3日間通気攪拌培養を行ない、得られた湿菌体360g（乾燥重量 110g）について、実施例1と同様に抽出、加水分解、メチルエステル化を行なったところ、総脂質29g、混合脂肪酸メチル18gを得た。このものの組成は、パルミチン酸メチル8%、ステアリン酸メチル1%、オレイン酸メチル29%、リノール酸メチル12%、γ-リノレン酸メチル11%、アラキドン酸メチル22%、その他17%であることが認められた。アラキドン酸メチルの生成量は培地当り、0.79g/ℓ、乾燥菌体当り36mg/gであった。

又、培養終了後、濾過によって得られた培養濾液 4,350ml を乾燥後、実施例1と同様に抽出、加水分解、メチルエステル化を行なったところ、

(17)

水メタノール-塩酸（95:5）を用いて20℃にて3時間処理してアラキドン酸のメチルエステル化を行なった。これをエーテルで抽出して200mgの脂肪酸メチルを得た。この脂肪酸メチルの組成はガスクロマトグラフィーによる分析で、パルミチン酸メチル9%、ステアリン酸メチル2%、オレイン酸メチル32%、リノール酸メチル9%、γ-リノレン酸メチル10%、アラキドン酸メチル21%、その他17%であることが認められた。この混合脂肪酸メチルをカラムクロマトグラフィーによって分離し、アラキドン酸メチル画分を分取し、ロータリーエバポレーターによって溶媒を留去した結果、25mgの精製されたアラキドン酸メチルを得た。本標品と市販のアラキドン酸メチル標準サンプルについて、ガスクロマトグラフィー分析、高速液体クロマトグラフィー分析及び質量分析によって比較を行なったところ、両者は、いずれの分析においても一致した。精製前及び精製後の「アラキドン酸メチル」量は培地当り、それぞれ0.84mg/ml、0.50mg/ml、乾燥菌体当り、

(16)

25%のアラキドン酸メチルを含む混合脂肪酸メチル 156mgを得た。

実施例 3

モルティエラ エキシクア (*Mortierella exigua*, IFO 8571)、及びモルティエラ ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*, IFO 5941) について実施例1と同様な操作を行なったところ、それぞれ72mg、95mgの脂肪酸メチルを得た。

これらの脂肪酸メチル中に含まれるアラキドン酸メチルを単離・精製したところ、それぞれ12mg、及び20mgであった。

実施例 4

グルコース2%、酵母エキス1%、Tween 20 0.2%、及び種々の炭化水素、脂肪酸ナトリウム、又は油脂0.5%を含む培地（pH 6.0）20mlを100ml容マイヤーに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・エロンガタ SAM 0219 (FERM BP-1239) 1白金耳を接種し、ロータリーシェーカー（200rpm）により28℃で5日間培養した。得られた菌体について、実施例1と同様に抽出、加水

(18)

6. 補正の対象

- (1) 明細書の「発明の名称」の欄
- (2) 明細書の「特許請求の範囲」の欄
- (3) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容

- (1) 明細書の発明の名称の欄を「アラキドン酸^{アラキドン酸}及びこれを含有する脂質^{脂質}の製造方法^{製造方法}」に補正する。
- (2) 特許請求の範囲を別紙の通りに補正する。
- (3) ① 明細書第1頁第18行目、及び第3頁第2行目「アラキドン酸」を「アラキドン酸及びこれを含有する脂質」に補正する。
- ② 同第3頁第10行目「製造方法」を「製造方法；及びモルティエラ属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてこれを採取することを特徴とするアラキドン酸を含有する脂質の製造方法」に補正する。

8. 添付書類の目録

特許請求の範囲

1通

(2)

6. 培養中の培養液に脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の方法。

(2)

2. 特許請求の範囲

1. モルティエラ (Mortierella)属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸、又はアラキドン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてアラキドン酸を採取することを特徴とするアラキドン酸の製造方法。
2. 培養開始前の培地に炭化水素、脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。
3. 培養中の培養液に脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。
4. モルティエラ (Mortierella)属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてこれを採取することを特徴とするアラキドン酸を含有する脂質の製造方法。
5. 培養開始前の培地に炭化水素、脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の方法。

(1)